

А.П. Бурлака¹
 І.І. Ганусевич¹
 В.В. Голотюк²
 А.В. Вовк¹
 С.М. Лукін¹
 Є.П. Сидорик¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

²Івано-Франківський Національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

Ключові слова: рак прямої кишки, церулоплазмін, трансферин, комплекси вільного заліза, комплекси церулоплазмін-НО, комплекси церулоплазмін-ММП.

ПОРУШЕННЯ У СИСТЕМІ ЦЕРУЛОПЛАЗМІН-ТРАНСФЕРИН У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

Обґрунтування та мета: розвиток злоякісних пухлин асоціюється зі зниженням рівнів церулоплазміну (ЦП) та трансферину (ТФ) в крові, яке може призводити до зростання в органах і крові вмісту вільного заліза, що має прооксидантні властивості. Механізми, наслідки та шляхи подолання таких порушень у хворих до початку і на різних етапах лікування залишаються до кінця не з'ясованими. **Мета** — дослідити у крові хворих на рак прямої кишки (РПК) рівні ЦП, ТФ, комплексів вільного заліза, комплексів ЦП-НО до лікування, після 13 сеансів променевої терапії та через 4–5 тиж після її закінчення (перед оперативним втручанням); рівні ЦП і матричної металопротеїнази (ММП)-2 у сироватці крові хворих на РПК та рак шлунка (РШ) при її інкубації *in vitro* за умов підвищеного вмісту ЦП. **Об'єкт і методи:** досліджено зразки венозної крові 32 хворих на РПК (стадія II–III), 7 хворих на РШ (стадія II–III) та 15 донорів (контрольна група). Визначення рівнів ЦП, ТФ, комплексів ЦП-НО, комплексів вільного заліза проводили методом електронного парамагнітного резонансу, активності ММП — методом зимографії. **Результати:** виявлено зниження фероксидантної та антиоксидантної активності ЦП та зростання рівнів вільного заліза у крові хворих на РПК; зареєстровано підвищення вмісту ТФ у крові хворих після курсу неоад'ювантної променевої терапії порівняно з показниками до початку лікування. Вперше у крові хворих на РПК зареєстровано утворення комплексів ЦП-НО. Встановлено *in vitro* зниження вмісту ЦП та активності ММП-2 у сироватці крові хворих на РПК і РШ, вірогідно, внаслідок утворення комплексів ЦП-ММП-2. **Висновки:** зниження фероксидантної та антиоксидантної активності ЦП може відбуватися за механізмом утворення комплексів ЦП-НО, ЦП-ММП-2. Накопичення комплексів вільного заліза може бути, зокрема, спричинене порушенням редокс-стану системи ЦП/ТФ та впливом променевої терапії. Характеристика змін у редокс-стані системи ЦП/ТФ є основою для їх корекції при лікуванні хворих на рак.

ВСТУП

При різних патологічних процесах, у тому числі пухлинному рості, відзначають порушення метаболізму заліза. Загальний і внутрішньоклітинний рівень останнього регулює, зокрема, церулоплазмін (ЦП), мобілізуючи залізовмісні сполуки з органів (найперше з печінки та селезінки). Розвиток злоякісних пухлин асоціюється зі зниженням рівнів ЦП та трансферину (ТФ) в крові, яке може призводити до зростання в органах і крові вмісту вільного заліза, що має прооксидантні властивості [1]. Роль системи ЦП/ТФ полягає в регулюванні обміну заліза та насиченні молекули апотрансферину іонами Fe^{3+} для транспортування в місця синтезу гемових та негемових залізовмісних білків. Відносно недавно з'явилися роботи, в яких *in vitro* було ідентифіковано комплекси ЦП із матриксними металопротеїназами (ММП)-2, -12 [2] — ферментами, роль яких у прогресуванні пухлинного процесу не викликає на сьогодні сумнівів. Утворення комп-

лексів ЦП-ММП гіпотетично може бути поясненням зниження рівня ЦП і, як наслідок, ТФ у крові хворих онкологічного профілю, але такий механізм взаємодії перелічених вище білків потребує подальшого дослідження.

Крім того, залишаються до кінця не з'ясованими механізми, наслідки та шляхи подолання згаданих порушень у хворих зі злоякісними пухлинами до початку і на різних етапах лікування. Зокрема, потребує вивчення вплив променевої терапії (ПТ) на редокс-стан системи ЦП/ТФ.

Мета роботи — дослідити у крові хворих на рак прямої кишки (РПК) рівні ЦП, ТФ, комплексів вільного заліза, комплексів ЦП з оксидом азоту (ЦП-НО) до лікування, після 13 сеансів ПТ та через 4–5 тиж після її закінчення (перед оперативним втручанням); взаємодію ЦП і ММП-2 у сироватці крові хворих на РПК та рак шлунка (РШ) при її інкубації *in vitro* за умов підвищеного вмісту ЦП.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено зразки венозної крові 32 хворих (17 чоловіків і 15 жінок, середній вік $62,0 \pm 1,8$ року) з діагнозом аденокарциноми прямої кишки II–III стадії (T2–4N0–2M0G2) та 7 пацієнтів із РШ II–III стадії (6 чоловіків та 1 жінка, середній вік $52,0 \pm 9,5$ року), які перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. У всіх пацієнтів діагноз, стадію захворювання і наявність метастазів верифіковано відповідно до вимог доказової медицини (у ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно). Контрольну групу становили 15 практично здорових осіб (донорів). Дослідження виконували відповідно до етичних принципів проведення біомедичних досліджень за участю людини, викладених в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації. Особи, залучені у дослідження, дали інформовану згоду на використання їх крові з дослідницькою метою.

На першому етапі лікування хворі на РПК отримували доопераційний курс дистанційної гамма-терапії на ділянку пухлини до сумарної вогнищевої дози 39 Гр (разова вогнищева доза — 3 Гр, 13 сеансів упродовж 2,5 тиж, 5 сеансів на тиждень), через 4–5 тиж виконували радикальне оперативне втручання. Критеріями виключення хворих при проведенні дослідження були: вік > 80 років; первинно-множинний характер пухлинного ураження; загальний тяжкий стан пацієнта при поступленні в стаціонар, зумовлений наявністю супутніх соматичних захворювань у стадії декомпенсації; прийом вітамінів-антиоксидантів хворим менш ніж за 1 міс до початку і під час проведення досліджень. Як антикоагулянт використовували 3% розчин трилону Б. У пробірку з 1 мл трилону Б набирали 5 мл крові з ліктьової вени; 0,5 мл відбирали та заморожували в спеціальній прес-формі в рідкому азоті для дослідження методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) рівнів ЦП, ТФ, комплексів ЦП-NO, комплексів вільного заліза. Решту крові поміщали в холодильник для її згортання. Проводили дослідження впливу ЦП на активність ММП-2 у сироватці крові хворих на РПК і РШ. До 0,5 мл крові донорів і хворих онкологічного профілю додавали розчин фармакопейного ЦП (2,0 мг ЦП розчиняли у 200 мкл фізіологічного розчину) та інкубували при температурі 37°C упродовж 30 хв; 1 та 1,5 год. Після цього вимірювали рівень ЦП і досліджували активність ММП-2 методом зимографії в поліакриламідному гелі [3].

Статистичний аналіз виконували за допомогою прикладних ліцензійних програм Origin 7.0 та SPSS 17.0. На рис. 1–7 наведено достовірні результати при $p < 0,05$.

Сучасні спектрометри ЕПР дають можливість досліджувати рівні ЦП, ТФ, метгемоглобіну, комплексів ЦП-NO, комплексів вільного заліза у біологічних середовищах. На рис. 1 наведено типові спектри ЕПР крові донора та хворого на РПК. Рівень ЦП у крові донора характеризує сигнал ЕПР з $g = 2,05$ (див. рис. 1, спектр ЕПР 1). На спектрі ЕПР 2 ЦП у крові пацієнта із РПК ЦП рееструють у вигляді комплексу з ендogenousним оксидом азоту (NO), при цьому на взаємодію ЦП з NO та утворення комплексу вказує триплетний сигнал ЕПР з $g = 2,007$. У крові виявлено також метгемоглобін і ТФ ($g = 6,0$ та $g = 4,25$ відповідно). Рівень комплексів вільного заліза у крові відображає широкий сигнал ЕПР з $g = 2,20$ – $2,40$.

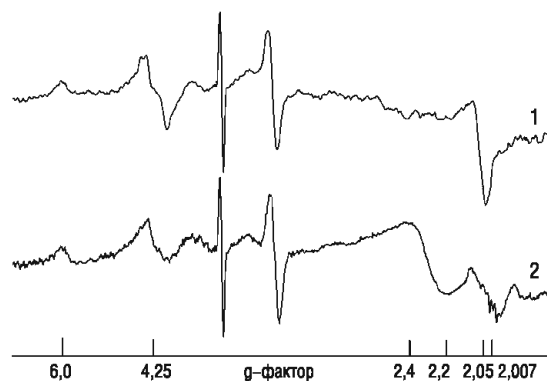


Рис. 1. Спектр ЕПР крові донора (1) та хворого на РПК (2) при температурі рідкого азоту (77 К)

Зниження рівня ЦП у крові хворих на РПК може бути наслідком втрати пептидною частиною ЦП залишків сіалових кислот. Іншою причиною зниження рівня циркулюючого ЦП у крові може бути також втрата молекулою ЦП іонів міді. Поява сигналу ЕПР із $g = 2,007$ у пацієнтів із РПК свідчить про утворення комплексів ЦП-NO та втрату ЦП фізіологічних функцій (див. рис. 2), що є наслідком зростання рівня ендogenousного NO [4]. У процесі взаємодії ЦП з NO важливе значення має мідь I типу, оскільки вона є мішенню для молекули NO. Важливо, що зниження вмісту міді в активних центрах ЦП поряд з утворенням комплексів ЦП-NO може призводити до пригнічення фероксидазної та антиоксидантної активності металоферменту [5, 6].

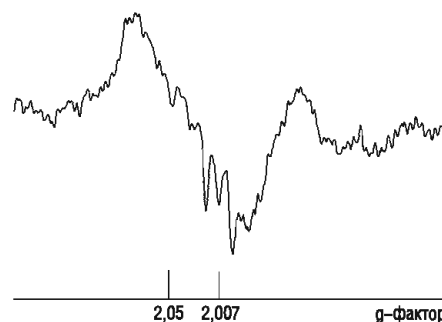


Рис. 2. Спектр ЕПР комплексу ЦП-NO у крові хворих на РПК

На рис. 3 наведено дані щодо вмісту ЦП у крові донорів і хворих на РПК до лікування, після 13 сеансів ПТ та через 4–5 тиж після її закінчення (перед оперативним втручанням). Виявлено, що рівень ЦП у крові хворих на РПК коливається в межах від 0,36 до 0,49, становлячи в середньому $0,41 \pm 0,05$ відн. од., що приблизно вдвічі нижче від рівня, характерного для донорів, у яких інтенсивність сигналу ЕПР ЦП в середньому становить $0,78 \pm 0,10$ відн. од. (див. рис. 3). Після 13 сеансів неоад'ювантної ПТ вміст ЦП достовірно не змінюється, його значення варіюють у діапазоні від 0,30 до 0,48 відн. од., у середньому становлячи $0,40 \pm 0,04$ відн. од., суттєво не відрізняючись від таких до проведення хірургічного етапу лікування. Таким чином, II етап комбінованого лікування у хворих на РПК — травматичне і тривале за часом оперативне втручання — виконують здебільшого на фоні порушення фероксидазної та антиоксидантної активності ЦП, що потребує корекції виявлених порушень для зниження рівня окисно-індукованих пошкоджень клітин.

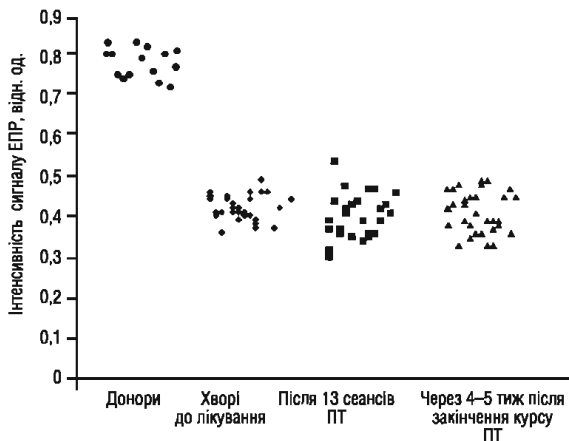


Рис. 3. Активність ЦП у крові хворих на РПК: • — донори; ◆ — хворі до лікування; ■ — після 13 сеансів ПТ; ▲ — через 4–5 тиж після закінчення курсу ПТ

При дослідженні вмісту ТФ у крові хворих зі злоякісними новоутвореннями прямої кишки виявлено, що він знижується у 3,6 раза порівняно з показниками донорів, для яких була характерною інтенсивність сигналу ЕПР на рівні $0,82 \pm 0,11$ відн. од. (див. рис. 4). Після 13-го сеансу неоад'ювантної ПТ у 75% хворих відзначали підвищення концентрації ТФ порівняно з середнім значенням до початку радіотерапії, тоді як у решти пацієнтів цей показник зберігався на вихідному рівні. Рівень ТФ у крові хворих на РПК перед операцією перебував у межах від 0,28 до 0,50 відн. од., становлячи в середньому $0,36 \pm 0,05$ відн. од. Основною функцією ТФ є участь в обміні заліза за рахунок його властивості легко зв'язувати і віддавати іони Fe^{3+} . При зниженні вмісту ТФ у крові хворих порушується транспорт заліза до місць його утилізації та синтезу гемових і негемових білків, що сприяє формуванню окисного фенотипу та проліферації клітин пухлини.

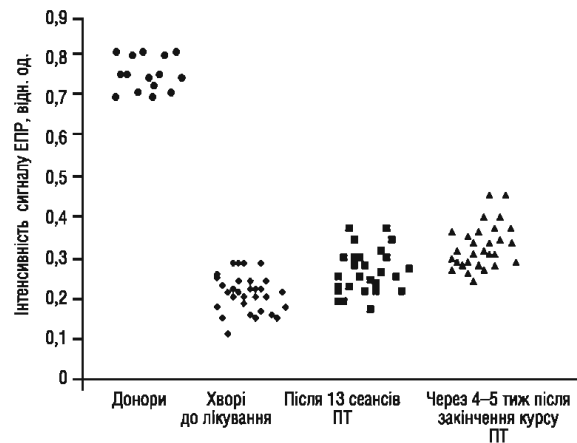


Рис. 4. Рівень ТФ у крові хворих на РПК: • — донори; ◆ — хворі до лікування; ■ — після 13 сеансів ПТ; ▲ — через 4–5 тиж після закінчення курсу ПТ

Наслідком порушення функціонування системи ЦП/ТФ та деградації залізовмісних білків у хворих на РПК є накопичення вільного заліза (див. рис. 5). Нами встановлено, що в крові хворих до лікування зазначений показник перевищує контрольні значення більш ніж у 10 разів та додатково зростає під час ПТ. Таким чином, вільне залізо являє собою інструмент посилення процесів окиснення в організмі хворого.

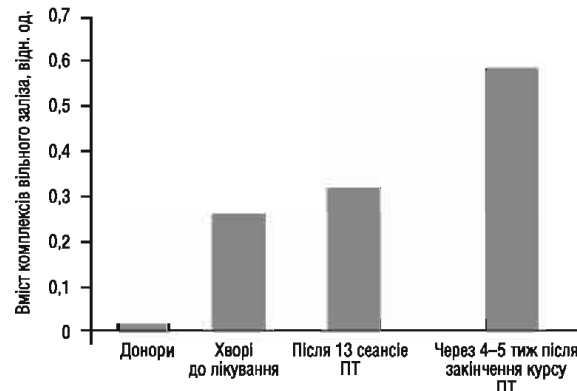


Рис. 5. Рівні вільного заліза в крові хворих на РПК

Зниження фероксидазної та антиоксидантної активності ЦП може бути спричинене утворенням комплексів ЦП-ММП [2]. На рис. 6 наведено рівні активності желатиназ у сироватці крові хворих на РПК за умов інкубації при підвищених рівнях ЦП.

При інкубації сироватки крові хворих на РПК з додаванням ЦП (2 мг/мл) відзначали поступове зниження його рівня — на 16% через 60 хв інкубації і ще на 6% — через 90 хв. При цьому активність ММП-2 значно знижувалася (майже на 40%) вже на 30-й хвилині інкубації, а через 90 хв становила 28% від початкового рівня. У контрольних зразках вихідний рівень ЦП досягав 80% від початкового в експерименті, до 90-ї хвилини інкубації він знизився до значень, близьких до кінцевого показника в експерименті, тобто загалом на 8%. Активність

ВИСНОВКИ

ММП-2 у контрольних зразках до 90-ї хвилини інкубації знизилася більше ніж на 20% проти 75% — в експерименті. Тобто при інкубації сироватки крові з підвищеною вихідною концентрацією ЦП його рівень знижується на 22%, активність ММП-2 — на 75%. Водночас у контролі реєструють зниження цих показників лише на 8 та 23% відповідно. Зміни аналогічного вектора відмічено також при інкубації з додаванням ЦП до сироватки крові у хворих на РШ (див. рис. 7). Така динаміка змін, вірогідно, характерна для пухлинного процесу та може бути наслідком утворення комплексів ЦП-ММП-2, в результаті якого знижується рівень обох показників. Цей механізм спричинює низькі рівні ЦП у пацієнтів з онкологічними захворюваннями порівняно з донорами.

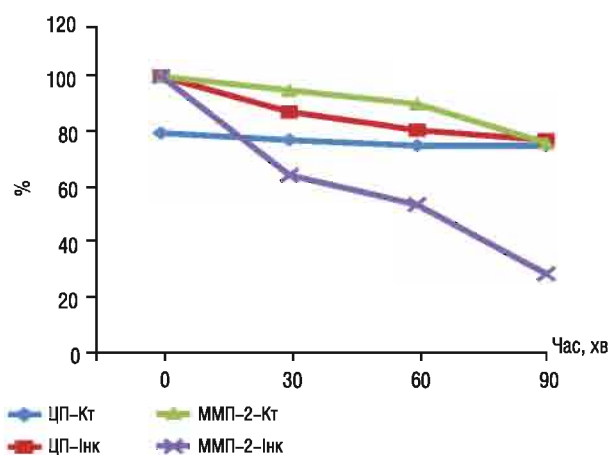


Рис. 6. Рівні активності ЦП та ММП-2 (відсоток від максимального значення) у сироватці крові хворих на РПК, інкубованій з додаванням ЦП (2 мкг/мл) упродовж 90 хв. Тут і рис. 7: Інк — інкубація; Кт — контрольні зразки

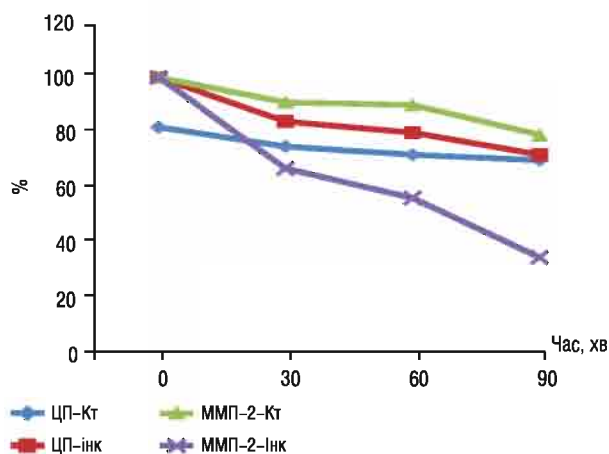


Рис. 7. Рівні активності ЦП та ММП-2 (відсоток від максимального значення) у сироватці крові хворих на РШ, інкубованій з додаванням ЦП (2 мкг/мл) упродовж 90 хв

Таким чином, взаємодія ЦП із ММП-2 може пояснювати отримані нами дані про зниження активності ЦП і ММП у хворих на РПК і РШ як до початку лікування, так і на фоні проведення терапевтичних заходів.

1. У крові хворих на РПК виявлено знижені рівні ЦП і ТФ до лікування порівняно з показниками донорів та зростання рівня ТФ у більшості пацієнтів при проведенні курсу неоад'ювантної ПТ. Вплив ПТ на пухлину проявляється підвищенням рівнів вільного заліза в крові цих хворих, що потребує корекції з метою зниження їх прооксидантного впливу.

2. Уперше в крові хворих на РПК виявлено утворення комплексів ЦП-NO, що є однією з причин зниження фероксидазної та антиоксидантної активності ЦП.

3. Показано, що при інкубації *in vitro* сироватки крові хворих на РПК та РШ (за умов підвищеного вмісту ЦП) відбувається зниження як вмісту ЦП, так і активності ММП-2, можливо, через утворення комплексів ЦП-ММП.

4. Отримані дані про зміни вмісту в крові хворих на РПК ЦП, ТФ, вільного заліза та про здатність ЦП утворювати комплекси з NO і ММП-2 можуть бути використані для розробки терапевтичних підходів з метою корекції порушень у редокс-стані системи ЦП/ТФ.

СПИСОК ВИКОРАСТАННОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К: Наукова думка, 2006. 227 с.
2. Sokolov AV, Pulina MO, Ageeva KV, *et al.* Identification of complexes formed by ceruloplasmin with matrix metalloproteinases 2 and 12. *Biochemistry (Moscow)* 2009; 74: 1388–92.
3. Бурлака АП, Ганусевич ІІ, Лук'ячук ЄВ *та ін.* Мітохондріальний редокс-контроль матриксних металопротейназ та метастазування у хворих на рак молочної залози. *Онкологія* 2010; 4: 377–82.
4. Shiva S, Wang X, Ringwood LA, *et al.* Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 486–93.
5. Burlaka AP, Sidorik EP, Ganusevich II, *et al.* Effects of radical oxygen species and NO: formation of intracellular hypoxia and activation of matrix metalloproteinases in tumor tissues. *Exp Oncol* 2006; 28: 49–53.
6. Vrancken K, Schroeder HJ, Longo LD, *et al.* Role of ceruloplasmin in nitric oxide metabolism in plasma of humans and sheep: a comparison of adults and fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 305: 1401–10.

DYSREGULATION IN CERULOPLASMIN-TRANSFERIN SYSTEM IN PATIENTS WITH RECTUM CANCER

A.P. Burlaka, I.I. Ganusevich, V.V. Golotiuk,
A.V. Vovk, S.M. Lukin, E.P. Sidorik

Summary. Background and aim: development of malignant tumors is associated with the decline of levels of ceruloplasmin (CP) and transferrin (TF) in blood, that can result in an increase in organs and blood of content of free iron that is prooxidant characteristics. Mechanisms, consequences and ways of overcoming of such dysregulations for patients before beginning and on the different stages of treatment remain

unclear to the end. **Aim:** to investigate the levels of CP, TF, complexes of free iron, complexes of CP-NO before treatment, after 13 sessions of radiotherapy and through 4–5 weeks after its completion (before operative intervention) in blood of patients with the rectum cancer (RC); levels of CP and matrix metalloproteinase (MMP)-2 in the blood serum of patients with rectum cancer and gastric cancer (GC) during its incubation of *in vitro* at the terms of enhanceable maintenance of CP. **Object and methods:** the specimens of venous blood were investigated in 32 patients with RC (stages II–III), 7 patients with GC (stages II–III) and 15 donors (control group). Determination of levels of CP, TF, complexes of CP-NO, complexes of free iron conducted the method of electronic paramagnetic resonance (EPR), activity of MMP — using zymography method. **Results:** it was educed decline of ferroxidase and antioxidant activity of CP and increase of levels of free iron in blood of patients with RC; the increase of content of TF is registered in blood of patients after the course of neoadjuvant radiotherapy comparatively with indexes to beginning of treatment. For the first time in blood of patients with RC formation of complexes of CP-NO was registered. It is set *in vitro* of decline of content of CP and

activity of MMP-2 in blood serums of patients with RC and GC, for certain, in the consequence of formation of complexes of CP-MMP-2. **Conclusions:** decline of ferroxidase and antioxidant activity of CP can take place after the mechanism of formation of complexes of CP-NO, CP-MMP-2. The accumulation of complexes of free iron can be, in particular, caused by violation of the redox-status of the system CP/TF and influence of radiotherapy. The changes in the redox-status of the system CP/TF is basis for its correction at treatment of patients with a cancer.

Key Words: rectal cancer, ceruloplasmin, transferrin, complexes of free iron, complexes of ceruloplasmin-NO, complexes of ceruloplasmin-MMP.

Адреса для листування:

Бурлака А.П.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: apburlaka@gmail.com

Одержано: 14.07.2014